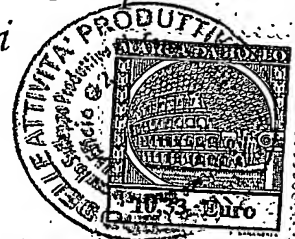




REC'D 0 4 MAR 2004

WIPO PCT

**Ministero delle Attività Produttive**  
 Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività  
 Ufficio Italiano Brevetti e Marchi  
 Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per **Invenzione Industriale**

N. MI2003 A 000043

)A

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY  
 DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

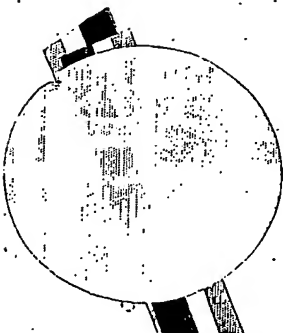
EPO - DG 1

0 9 02. 2004

(77)

14 GEN. 2004

Roma, li .....



IL DIRIGENTE

Paola Giuliano

D.ssa Paola Giuliano

BEST AVAILABLE COPY

## AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **COIMEX s.c.r.l. UNITED COMPANIES**Residenza **REGGIO EMILIA**codice **01595420356**

2) Denominazione

Residenza

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. Diego Pallini ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**via **C.so di Porta Vittoria**

n.

9

città

**Milano**

cap

**20122**

(prov)

**MI**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) **A61B**

gruppo/sottogruppo

**Uso di esteri retinoici dell'acido ialuronico in cellule staminali totipotenti**

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) **PERBELLINI Alberto**

3)

**MAIOLI Margherita**

cognome nome

2) **VENTURA Carlo**

4)

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R1) **nessuna**

2)

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**nessuna**

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **29**Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **05**Doc. 3) **1** **RIS**Doc. 4) **0** **RIS**Doc. 5) **0** **RIS**Doc. 6) **0** **RIS**Doc. 7) **0**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale Euro

**Duecentonovantuno/80.=**COMPILATO IL **14/01/2003**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Diego Pallini**

obbligatorio

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

**SI**CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO****MILANO**codice **155**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI2003A 000043**

Reg. A.

L'anno

**DUEMILATRE****OTTANTORDICI**

del mese di

**GENNAIO**

Il(I) richiedente(i) sopradenunciato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto

**00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartito.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

**Marcella Marzotto**

dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

**M. GORTONESI**

3852PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2003A 000043 REG. A

DATA DI DEPOSITO 14.01.2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

D. TITOLO

Uso di esteri retinoici dell'acido ialuronico in cellule staminali totipotenti.

L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda un nuovo uso di esteri retinoici dell'acido ialuronico, che risultano avere attività prodifferenziante su cellule staminali totipotenti.

L'invenzione riguarda inoltre un procedimento per differenziare tali cellule staminali ed un procedimento per selezionare molecole che modulano l'attività prodifferenziante di tali esteri.



M. DISEGNO

Descrizione della Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Uso di esteri retinoici dell'acido ialuronico in cellule staminali totipotenti."

a nome di : COIMEX s.c.r.l. UNITED COMPANIES

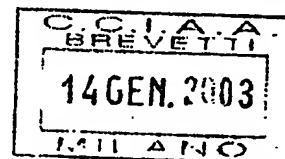
con sede in : REGGIO EMILIA

Inventori designati : PERBELLINI Alberto, VENTURA Carlo,

MAIOLI Margherita

\*\*\*\*\*

MI 2003 A 0 0 0 0 4 3



### CAMPO DELL'INVENZIONE

Il campo dell'invenzione è quello della preparazione di cellule staminali *in vitro* adatte per terapia cellulare.

### TECNICA ANTERIORE

L'utilizzo di cellule staminali si propone come uno strumento innovativo per una serie di strategie di riparazione e ricostruzione tissutale, ad esempio per la riparazione o la ricostruzione del tessuto miocardico danneggiato da infarto miocardico o in seguito a cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative su base congenita o acquisita, associate a distruzione delle unità contrattili cardiache: i cardiomiociti.

Queste nuove strategie sono di estremo interesse soprattutto nei paesi industrializzati dove le malattie cardiovascolari rappresentano una causa preponderante di mortalità.

I tentativi finora effettuati hanno riguardato l'iniezione diretta di cellule staminali ad uno stadio indifferenziato nel tessuto cardiaco di topi o ratti sottoposti ad infarto sperimentale (Orlic D, et al. *Nature*. 2001;410:701-705.). Gran parte delle cellule iniettate veniva eliminata da fenomeni

A handwritten signature in dark ink, located in the bottom right corner of the page.

apoptotici e soltanto una percentuale esigua viene "istruita" dal miocardio del ricevente a differenziarsi in cardiomiociti embrionali, con meccanismi ancora non ben identificati. Con questa strategia, il differenziamento delle cellule staminali trapiantate in cardiomiociti deve avvenire in vivo, nel miocardio del ricevente ed ha una resa bassissima, con scarsa riparazione del danno tissutale e minima ripresa funzionale dal punto di vista emodinamico.

In esperimenti condotti su modelli murini di scompenso cardiaco è stato invece dimostrato che i cardiomiociti già differenziati da cellule staminali totipotenti e selezionati rispetto agli altri fenotipi cellulari mediante "gene trapping" sono in grado di sopravvivere dopo il trapianto nel miocardio e di integrarsi stabilmente con il tessuto miocardico del ricevente (Klug MG et al *J. Clin Invest.* 1996;98:216-224.).

I meccanismi di induzione del differenziamento cellulare sono tuttavia molto complessi e solo parzialmente delucidati. Essi, attraverso l'attivazione di un numero ristretto di fattori di trascrizione tessuto-specifici, sono in grado di orchestrare profili multipli di espressione genica finalizzandoli alla specificazione dell'architettura miocardica.

Gli stessi autori della presente invenzione hanno contribuito a delucidare alcuni passaggi chiave della cardiogenesi, dimostrando come l'espressione dei geni codificanti per i fattori di trascrizione GATA-4 ed Nkx-2.5 inducesse la comparsa dei trascritti cardiospecifici  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) e myosin light chain 2-V (MLC) e di un fenotipo miocardico in cellule embrionali staminali (Ventura C, Maioli M. *Circ Res.* 2000;87:189-194). È stato inoltre individuato un complesso sistema



endorfinergico in grado di innescare e orchestrare con meccanismi di tipo autocrino l'espressione di tali "geni architetti" della cardiogenesi (Ventura C, Maioli M. *Circ Res.* 2000;87:189-194).

In questo contesto, i procedimenti in grado di indurre il differenziamento cellulare nelle cellule staminali con precisione ed efficienza sono assolutamente desiderabili e si propongono come uno strumento innovativo per una serie di strategie di riparazione e ricostruzione tissutale.

La resa del processo cardiogenetico in cellule staminali è infatti attualmente fortemente limitata dal fatto che l'evoluzione verso il fenotipo miocardico rappresenta solo una piccola parte di tutti i possibili orientamenti differenziativi a cui possono andare in contro tali cellule. In cellule staminali pluripotenti, dotate cioè di una capacità differenziativa più ristretta rispetto a quelle totipotenti, di derivazione embrionale, il processo della cardiogenesi può essere indotto mediante dimetilsolfossido (DMSO). Tuttavia, come riscontrato in cellule P19, linea di cellule pluripotenti derivate da un carcinoma embrionale murino, non più del 15-20% di tali cellule si differenzia in cardiomiociti embrionali in presenza di DMSO (McBurney MW, Jones-Villeneuve EMW, Edwards MKS, Anderson PJ. *Nature.* 1982;299:165-167). Inoltre il DMSO, in cellule staminali totipotenti (Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. *Circ Res.* 2002;91:501-508), non è in grado di produrre un aumento significativo della percentuale di cellule che si differenziano in cardiomiociti.

L'acido retinoico, un'altra sostanza capace di agire come agente

differenziante in cellule staminali, promuove eventi differenziativi diversi e variabili a seconda del tipo cellulare oggetto di studio, inducendo un differenziamento neuronale in cellule pluripotenti P19 (McBurney MW, et al. *Nature*. 1982;299:165-167) e risultando capace di indurre il differenziamento cardiaco in alcune linee di cellule staminali (Wobus AM, et al. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1525-1539) ma privo di azione cardiogenetica in cellule staminali totipotenti umane (Xu C, et al. *Circ Res*. 2002;91:501-508).

Attualmente quindi, anche se alcuni meccanismi determinanti per la cardiogenesi si stanno chiarendo, nessuno dei trattamenti clinici e farmacologici al momento disponibili consente di sostituire la perdita di cardiomiociti e quindi di bloccare la progressione del danno miocardico verso uno stato di scompenso cardiaco, che quindi rappresenta ancora un evento clinicamente irreversibile in un numero consistente di pazienti cardiopatici.

## SOMMARIO

La presente invenzione riguarda l'uso di esteri ialuronici dell'acido retinoico come agenti prodifferenzianti di cellule staminali.

In particolare essi sono in grado inoltre di promuovere la comparsa di un fenotipo miocardico caratterizzato dalla presenza di cardiomiociti embrionali dotati di attività contrattile spontanea.

Gli esteri dell'invenzione sono parzialmente o totalmente esterificati con l'acido retinoico. Quando l'acido ialuronico non è totalmente esterificato con l'acido retinoico può essere esterificato con altri acidi alcanoici a catena corta, ad esempio propanoico o butirrico, che è il preferito.



Gli esteri hanno inoltre preferibilmente un peso molecolare compreso tra 10.000 e 30.000 Dalton: tale "peso molecolare" si intende riferito al peso molecolare medio ponderale (MW) del solo acido ialuronico, escludendo cioè il contributo dei residui butirrici e retinoici.

E' stato sorprendentemente osservato che gli esteri dell'acido retinoico hanno una capacità prodifferenziante su cellule staminali totipotenti, del tutto diversa da quella dell'acido retinoico, in quanto sono in grado di differenziare in senso cardiogenetico le cellule staminali e di determinare sia la trascrizione di un profilo di geni cardiogenetici (geni che precorrono o inducono la trascrizione dei geni cardiospecifici) che di geni cardiospecifici veri e propri.

Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione riguarda l'uso degli esteri ialuronici dell'acido retinoico per aumentare l'efficienza del processo di induzione del fenotipo miocardico e per generare cardiomiociti di utilizzo per la terapia cellulare di ricostruzione in tutte le patologie associate alla distruzione delle unità contrattili cardiache.

In un suo aspetto ulteriore, l'invenzione riguarda inoltre l'uso degli esteri dell'invenzione per la preparazione di farmaci per il trattamento e la prevenzione di danni del miocardio e nelle cardiopatie acute o congenite, in particolare per il trattamento dell'infarto del miocardio.

In un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda un procedimento per l'attivazione dei geni responsabili della cardiogenesi in cellule staminali di mammifero, in particolare murine ed umane e quindi per la preparazione e l'isolamento di cellule staminali differenziate in senso cardiogenetico, estendosi alla preparazione di cardiomiociti *in vitro*.





L'invenzione si estende inoltre all'uso delle cellule isolate, differenziate secondo l'invenzione, per la messa a punto dei sistemi di selezione in vitro di farmaci per la modulazione della cardiogenesi.

La presente invenzione comprende infine un metodo terapeutico per il trattamento dello scompenso cardiaco dovuto a patologie acquisite (post-infartuale, ischemico, associato a danni valvolari) o su base genetica (cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative), o dell'infarto del miocardio.

#### **DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

**Figura 1. Effetti di HRE sull'espressione di geni induttori della cardiogenesi in cellule embrionali staminali.**

Dopo la rimozione del LIF, le cellule sono state trattate in assenza (-) o in presenza (+) di esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) per un periodo complessivo di 10 giorni.

EBs: corpi embrioni dopo 5 giorni dalla rimozione del LIF (Leukemia Inhibitory Factor). P: cardiomiociti selezionati con puromicina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. A, B, C, RNase protection dell'mRNA di GATA-4, Nkx-2.5 e prodinorfina. A sinistra sono riportate le immagini autoradiografiche relative all'espressione di ciascun trascritto. A destra viene mostrata l'analisi quantitativa dei livelli di ciascun mRNA.

\* Differenze significative rispetto alle cellule non trattate.

**Figura 2. Effetto di HRE sull'espressione di geni cardiospecifici in cellule staminali.**

Dopo la rimozione del LIF, le cellule sono state trattate in assenza (-) o in presenza (+) di HRE-18 (0.75 mg/ml) per un periodo complessivo di

10 giorni. La figura mostra un gel marcato con bromuro d' etidio relativo all' RT-PCR dell' effetto prodotto da esteri retinoici dell'acido ialuronico sull' espressione di "alpha myosin heavy chain" (MHC) e "myosin light chain-2V (MLC) in corpi embriodi (EBs) dopo 5 giorni dalla rimozione del LIF e in cardiomiociti selezionati con puromicina (P) dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. In un gruppo di esperimenti, le cellule staminali sono state trattate per 10 giorni con esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) in presenza di cheleritina 1  $\mu$ M (Chel), specifico inibitore della PKC. In queste cellule, l' analisi dell' espressione genica è stata condotta su cardiomiociti selezionati con puromicina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF.

**Figura 3. Effetto di HRE sulla velocità di trascrizione dei geni GATA-4 e Nkx-2.5.**

A,B, autoradiogrammi relativi a "nuclear run-off transcription" dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5, rispettivamente. Dopo la rimozione del LIF, le cellule sono state trattate in assenza (-) o in presenza (+) di esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) per un periodo complessivo di 10 giorni. EBs, corpi embriodi dopo 5 giorni dalla rimozione del LIF. P, cardiomiociti selezionati con puromicina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. In un gruppo di esperimenti, le cellule staminali sono state trattate per 10 giorni con esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) in presenza di cheleritina 1  $\mu$ M (Chel), specifico inibitore della PKC. L' analisi trascrizionale è stata quindi condotta in nuclei isolati da cardiomiociti selezionati con puromocina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. a, velocità di trascrizione dei geni GATA-4 o Nkx-2.5. b, velocità

di trascrizione del gene della ciclofilina, usato come controllo interno.

**Figura 4. Effetto di HRE sulla velocità di trascrizione del gene della prodinorfina.**

La figura mostra l'autoradiogramma relativo al "nuclear run-off transcription" del gene. Dopo la rimozione del LIF, le cellule sono state trattate in assenza (-) o in presenza (+) di esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) per un periodo complessivo di 10 giorni. EBs, corpi embriodi dopo 5 giorni dalla rimozione del LIF. P, cardiomiociti selezionati con puromicina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. In un gruppo di esperimenti, le cellule staminali sono state trattate per 10 giorni con esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) in presenza di cheleritina 1  $\mu$ M (Chel), specifico inibitore della PKC. L'analisi trascrizionale è stata quindi condotta in nuclei isolati da cardiomiociti selezionati con puromocina dopo 10 giorni dalla rimozione del LIF. a, velocità di trascrizione del gene della prodinorfina. b, velocità di trascrizione del gene della ciclofilina, usato come controllo interno.



**Figura 5. Effetto di HRE sulla resa del processo cardiogenetico in cellule staminali.** Dopo la rimozione del LIF (Day 0), le cellule GTR1 sono state coltivate in assenza (○) o in presenza di esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) (●) o di esteri misti dell'acido retinoico con ialuronato e butirrato (◆) per un periodo complessivo di 10 giorni. Il numero di colonie di cardiomiociti caratterizzate da attività contrattile spontanea è stato considerato come indice della specificazione di un fenotipo miocardico embrionale. \* Significativamente diverso da (○); §, significativamente diverso da (●).

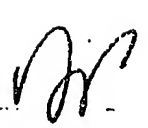
**DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione riguarda l'uso di esteri ialuronici dell'acido retinoico come agenti prodifferenzianti di cellule staminali.

Tali esteri hanno effetto sull'espressione di geni induttori della cardiogenesi e di geni cardiospecifici in cellule embrionali staminali totipotenti. Essi sono in grado inoltre di promuovere la comparsa di un fenotipo miocardico caratterizzato dalla presenza di cardiomiociti embrionali dotati di attività contrattile spontanea, preferibilmente organizzati tridimensionalmente.

Gli esteri aventi tale attività sono esteri in cui i gruppi ossidrilici delle unità monosaccaridiche dell'acido ialuronico, sono parzialmente o totalmente esterificati con l'acido retinoico. Il grado di sostituzione dell'acido retinoico in questi esteri è preferibilmente compreso tra 0.00001 e 0.5 o, ancor più preferibilmente tra 0.001 e 0.1, dove con grado di sostituzione (DS) viene indicato il numero di moli di acido retinoico per moli di polisaccaride.

Quando l'acido ialuronico non è totalmente esterificato con l'acido retinoico può essere esterificato con altri acidi alcanoici a catena corta, ad esempio propanoico o butirrico, che è il preferito. In questo caso specifico, gli esteri misti preferiti sono esteri misti dell'acido ialuronico con gli acidi retinoico e butirrico ed hanno preferibilmente un grado di sostituzione con acido butirrico compreso tra 0.05 e 1.0, un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1 ed un rapporto tra il grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico ( $Ds_{AR}/Ds_{AcBu}$ ), di almeno 6.



Per "grado di sostituzione" si intende il numero di ossidrili esterificati per ogni unità ripetitiva dell'acido ialuronico (dimero GlcNAc-GlcUA).

Con il termine "acido retinoico" o "(AR)" si intendono tutte le forme isomeriche in cui si presenta questo composto, quindi sia la forma naturale (con tutti i doppi legami in forma *trans*), che tutte le altre forme isomeriche possibili.

Gli esteri hanno inoltre preferibilmente un peso molecolare compreso tra 10.000 e 30.000 Dalton: tale "peso molecolare" si intende riferito al peso molecolare medio ponderale (MW) del solo acido ialuronico, escludendo cioè il contributo dei residui butirrici e retinoici.

E' stato sorprendentemente osservato che gli esteri dell'acido retinoico hanno una capacità prodifferenziante su cellule staminali totipotenti, del tutto diversa da quella dell'acido retinoico, in quanto sono in grado di differenziare in senso cardiogenetico le cellule staminali. E' noto infatti che l'acido retinoico in un sistema costituito da cellule pluripotenti murine P19 induce invece differenziamento in senso neuronale (McBurney MW, et al. *Nature*. 1982;299:165-167) mentre non ha alcun effetto su cellule staminali umane (Xu C., et al. *Circ. Res.* 2002, 91:501-508).

Un effetto cardiogenetico è invece osservabile *in vitro* trattando con DMSO cellule pluripotenti murine, anche se l'efficienza dell'intero procedimento è piuttosto bassa.

In particolare la somministrazione di esteri polisaccaridici dell'acido retinoico a cellule staminali in coltura è in grado di determinare sia la trascrizione di un profilo di geni cardiogenetici (geni che precorrono o inducono la trascrizione dei geni cardiospecifici) che dei geni



cardiospecifici veri e propri.

Gli effetti degli esteri dell'invenzione si estendono a tutte le cellule staminali di mammifero, preferibilmente di derivazione embrionale, quali ad esempio le cellule H1, H7, H9, H9.1 e H9.2 descritte in Thomson JA, et al. *Science*, 1998, 282:1145-1147 ed in Amit M, et al. *Dev Biol.*, 2000, 227:271-278, oppure alle cellule staminali isolabili secondo metodi noti nell'arte.

L'effetto degli esteri dell'invenzione è stato misurato in cellule staminali totipotenti murine preferibilmente GTR1 (Nagy A, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8424-8428), selezionabili per un fenotipo miocardico mediante "gene trapping" (Klug MG, et al. *J Clin Invest.* 1996;98:216-224). La strategia del "gene trapping" rappresenta tuttavia un approccio di selezione fenotipico e non uno strumento per incrementare la resa del processo cardiogenetico. Pertanto, l'effetto degli esteri dell'invenzione si estende anche a cellule staminali non selezionabili attraverso "gene-trapping". Il trattamento con gli esteri dell'acido retinoico induce la trascrizione di geni coinvolti nella cardiogenesi. In particolare aumentano il trascritto della prodinorfina, quello dell'omeodominio Nkx-2.5 (omologo al gene *tinman* di *Drosophila*) fattore di trascrizione le cui mutazioni determinano cardiopatie congenite anche nell'uomo, del gene GATA-4, codificante per una proteina appartenente alla famiglia dei fattori a "zinc-finger domain". Inoltre, aumenta anche la trascrizione di geni cardiospecifici, quali il gene della catena alfa della miosina pesante e del gene della isoforma 2V della catena leggera della miosina (MLC-2V). Quest'ultimo marcatore è particolarmente importante perché

identifica il posizionamento ventricolare dei miociti cardiaci nel corso della cardiogenesi. L'effetto osservato non è ascrivibile ad una semplice stabilizzazione del trascritto, ma è invece dovuto ad un aumento della velocità di trascrizione di questi geni. Pertanto, l'invenzione riguarda in un suo primo aspetto l'uso degli esteri ialuronici dell'acido retinoico per aumentare l'efficienza del procedimento di induzione dell'orientamento cardiogenetico in cellule staminali non differenziate, preferibilmente attraverso l'attivazione di geni cardiogenici, quali la prodinorfina, l'omeodominio Nkx-2.5 ed il GAT4, appartenente alla famiglia dei fattori a zinc-finger domain.

In un secondo aspetto, l'invenzione riguarda l'uso degli esteri ialuronici dell'acido retinoico per aumentare la trascrizione di geni cardiospecifici, quali ad esempio quelli codificanti per proteine essenziali nel processo della contrazione del muscolo cardiaco, quali la catena alfa della miosina pesante e la catena leggera 2V della miosina (MLC-2V).

Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione riguarda l'uso degli esteri ialuronici dell'acido retinoico per aumentare l'efficienza del processo di induzione del fenotipo miocardico nel suo complesso, caratterizzato dalla generazione, a partire da cellule staminali, di cardiomiociti embrionali dotati di attività contrattile spontanea.

L'aumento dell'espressione di geni cardiogenetici e cardiospecifici indotto dagli esteri retinoici dell'acido ialuronico dimostra che tali sostanze sono in grado di manipolare un programma genico di differenziamento cardiaco consentendo una possibile alternativa a tecniche di terapia genica complesse e a volte rischiose.



*Ar*

Gli esteri dell'invenzione sono particolarmente attivi in un sistema in vitro di cellule staminali totipotenti a concentrazioni preferibilmente comprese tra 0.01 e 5 mg/ml, ancor più preferibilmente comprese tra 0.5 e 2.0 mg/ml.

Gli esteri della presente invenzione risultano quindi composti estremamente innovativi per la terapia cellulare di ricostruzione nel caso di infarto miocardico, di cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative determinate su base congenita o acquisita, cioè di tutte le patologie associate alla distruzione delle unità contrattili cardiache: i cardiomiociti. Tali cellule, infatti sono quiescenti e, a differenza dei miociti del muscolo scheletrico e di altri tipi cellulari quali cellule cutanee ed epatiche, non sono più in grado di proliferare in risposta ad un danno tissutale.

In un suo aspetto ulteriore, l'invenzione riguarda inoltre l'uso degli esteri dell'invenzione per la preparazione di farmaci per il trattamento e la prevenzione di danni del miocardio e nelle cardiopatie acute o congenite, in particolare per il trattamento dell'infarto del miocardio.

In un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda un procedimento per l'attivazione dei geni responsabili della cardiogenesi in cellule staminali di mammifero, in particolare murine ed umane e quindi per la preparazione e l'isolamento di cellule staminali differenziate in senso cardiogenetico. Il procedimento comprende essenzialmente una fase di incubazione delle cellule staminali in terreno di coltura quale ad esempio il DMEM, preferibilmente in presenza di siero dove gli esteri sono aggiunti in quantità comprese tra 0.01 e 5 mg/ml, ancor più preferibilmente comprese tra 0.5 e 2.0 mg/ml. In questo contesto, l'



incremento della resa del processo di cardiogenesi, valutato determinando il numero di colonie cellulari caratterizzate da attività contrattile spontanea, è di almeno 3 volte rispetto alle cellule di controllo non trattate (Figura 5). Il trattamento con esteri è seguito opzionalmente da una fase di selezione dei cardiomiociti, preferibilmente mediante l'approccio di "gene-trapping" in cui il gene chimerico è costituito dal promotore di "alpha-myosin heavy chain" seguito da un gene in grado di indurre resistenza a chemioterapici anche diversi dalla puromicina, ad esempio la geneticina o il G418. Inoltre, il gene chimerico usato per la selezione mediante gene trapping potrà essere stabilmente integrato nel genoma della linea cellulare staminale, come nel caso delle cellule GTR1, o potrà essere inserito nelle cellule staminali solo transientemente ad esempio mediante elettroporazione (Klug MG et al *J. Clin Invest.* 1996;98:216-224). In quest'ultimo caso il costrutto chimerico non si integrerà nel genoma cellulare ma sarà presente nel nucleo ove potrà essere trascritto per periodi di tempo limitati, ma comunque sufficienti per operare un processo selettivo fenotipico. Questa strategia di "gene trapping", pur non consentendo di generare una linea cellulare stabile ai fini del processo selettivo, è di notevole interesse in vista di un eventuale approccio di terapia cellulare del danno miocardico nell'uomo, in cui è auspicabile una permanenza ed una espressione limitata nel tempo di un gene chimerico all'interno della cellula staminale. Gli esteri oggetto dell'invenzione sono utilizzati anche in combinazione con approcci selettivi diversi dal "gene trapping" quali l'isolamento meccanico, ad esempio mediante pipetta Pasteur delle colonie di



cardiomiociti spontaneamente contrattili.

L'efficienza del processo cardiogenetico nel suo complesso è misurata, al termine della selezione, preferibilmente come incremento percentuale del numero di colonie di cardiomiociti dotati di attività contrattile spontanea, rispetto al n° di colonie comparse nei non-trattati.

Le cellule differenziate secondo l'invenzione, ed ulteriormente selezionate sono quindi dei cardiomiociti embrionali capaci di contrarsi e non elementi indifferenziati come nel caso dei tentativi finora effettuati. I cardiomiociti ottenuti secondo quanto descritto nell'invenzione sono quindi di utilità nella terapia cellulare di pazienti con infarto miocardico o con scompenso cardiaco dovuto a patologie acquisite (post-infartuale, ischemico, associato a danni valvolari) o determinate su base genetica (cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative).

L'invenzione si estende inoltre all'uso delle cellule isolate, differenziate secondo l'invenzione, per la messa a punto dei sistemi di selezione in vitro di farmaci per la modulazione della cardiogenesi, preferibilmente per la modulazione di almeno uno dei seguenti geni: GATA, preferibilmente GATA-4, NKX-2.5, catena alfa della miosina pesante, catena leggera della miosina, prodinorfina, d-HAND, MEF e geni di canali ionici cardiaci.

Alternativamente, il procedimento di differenziamento secondo l'invenzione può essere utilizzato per la selezione di molecole farmacologicamente attive nel modulare lo sviluppo o l'attività cardiaca o i processi di riparazione del tessuto cardiaco. In questi saggi le cellule staminali sono preferibilmente scelte tra: cellule P19, cellule D3, cellule

R1, cellule GTR1, cellule H1, H7, H9, H9.1 e H9.2 descritte in Thomson JA, et al. *Science*, 1998, 282:1145-1147 ed in Amit M, et al. *Dev Biol.*, 2000, 227:271-278, cellule staminali isolabili secondo metodi noti nell'arte.

Gli esteri della presente invenzione sono agenti cardiogenetici per le cellule staminali e sono quindi utilizzabili per la riparazione del danno miocardico con cellule staminali autologhe o eterologhe. La presente invenzione quindi comprende un procedimento per indurre il differenziamento cardiogenetico *ex-vivo* in cellule staminali autologhe o eterologhe per la riparazione del tessuto cardiaco nell'infarto miocardico o nello scompenso cardiaco dovuto a patologie acquisite (post-infartuale, ischemico, associato a danni valvolari) o determinate su base genetica (cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative), comprendente il trattamento delle cellule staminali autologhe o eterologhe con gli esteri della presente invenzione in terreno di coltura adatto, opzionalmente la selezione dei cardiomiociti contrattili ed il successivo re-impianto dei cardiomiociti *in vivo*.



La presente invenzione comprende quindi un metodo terapeutico per il trattamento dello scompenso cardiaco dovuto a patologie acquisite (post-infartuale, ischemico, associato a danni valvolari) o su base genetica (cardiomiopatie ipertrofiche o dilatative), o dell'infarto del miocardio, che comprende l'isolamento di cellule staminali preferibilmente autologhe, il trattamento di tali cellule con gli esteri retinoidi dell'acido ialuronico, opzionalmente la selezione di cellule staminali differenziate, ed il successivo re-impianto dei cardiomiociti

differenziati nel paziente.

La sopravvivenza di cellule differenziate *in vitro* o *ex vivo* in cardiomiociti embrionali contrattili è superiore a quella ottenuta negli attuali studi preclinici che utilizzano cellule indifferenziate. Inoltre, a causa delle loro caratteristiche embrionali, i cardiomiociti trapiantati possiedono ancora attività proliferativa e possono teoricamente formare una massa miocardica considerevole prima di differenziarsi ulteriormente in cellule adulte ed entrare in una fase stabile di quiescenza proliferativa.

Il risultato ottenuto con gli esteri della presente invenzione rappresenta quindi un risultato estremamente importante poiché viene aumentata l'efficienza di un procedimento di attivazione di un numero ristretto di fattori di trascrizione tessuto-specifici, che porta ad orchestrare profili multipli di espressione genica, finalizzandoli alla specificazione intra- e sovra-cellulare dell'architettura miocardica ed aumentando l'intera resa del procedimento di cardiogenesi finalizzata alla riproduzione *in vitro* dell'architettura miocardica, di almeno due volte rispetto a cellule non trattate.

Dato l'effetto di coordinazione degli eventi preliminari e degli eventi specifici del differenziamento cardiaco ottenuto con gli esteri della presente invenzione, l'uso degli esteri dell'invenzione si estende quindi alla preparazione di cardiomiociti *in vitro*.

## PARTE SPERIMENTALE

### METODI

Analisi dell'espressione genica. L' RNA totale è stato estratto da cellule staminali come descritto da Ventura et al. (Ventura C et al. *J Biol Chem.*



1997;272:6685-6692). I livelli di specifici mRNA sono stati analizzati mediante "RNase protection", utilizzando sonde di cRNA (mRNA antisenso) radiomarcate con [ $^{32}$ P]CTP specifiche per ciascun trascritto di interesse, secondo un protocollo precedentemente descritto (Ventura C. et al. *J Biol Chem.* 1997;272:6685-6692). In breve, frammenti degli esoni principali dei geni GATA-4 (292 bp), Nkx-2.5 (414 bp) e prodinorfina (424 bp) sono stati inseriti nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen). La trascrizione del vettore linearizzato con *Apal*, *BamHI*, or *XbaI* generava, rispettivamente, filamenti di mRNA senso della prodinorfina, di GATA-4, o di Nkx-2.5. La trascrizione in presenza di [ $^{32}$ P]CTP del plasmide linearizzato con *BamHI* produceva filamenti di mRNA antisenso della prodinorfina e di Nkx-2.5, mentre la trascrizione del vettore in presenza di *XbaI* generava un filamento di mRNA antisenso di GATA-4. In alcuni esperimenti l'analisi dell'espressione di mRNA è stata condotta mediante RT-PCR, come descritto in (Ventura C, Maioli M. *Circ Res.* 2000;87:189-194).

Studio della trascrizione genica. La velocità di trascrizione genica è stata analizzata in nuclei isolati mediante un approccio di "in vitro nuclear run-off transcription", precedentemente descritto (Ventura C., *J Biol Chem.* 1997;272:6685-6692.; Ventura C. et al. *J Biol Chem.* 1998;273:13383-13386.). In sintesi, i nuclei sono stati risospesi in un tampone contenente 50 mmol/L Tris/HCl, pH 8.0, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 40% glycerol, 0.1 mmol/L dithiothreitol, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride, 1  $\mu$ mol/L leupeptin, e 10 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol. Alla sospensione nucleare (90  $\mu$ l) sono stati aggiunti

100 µl di 2 x reaction buffer (10 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mol/L KCl, 5 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L di ATP, GTP, e CTP), e 5 µl di [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (3000 Ci/mmol). E' stata quindi condotta un' incubazione a temperatura ambiente per 15 min. La reazione è stata arrestata digerendo il DNA in presenza di RNase-free DNase. L' RNA nucleare è stato isolato come descritto in Ventura C et al. *J Biol Chem.* 1997;272:6685-6692. Circa 5 x 10<sup>6</sup> cpm di RNA nucleare marcato con <sup>32</sup>P sono stati ibridizzati per 12 ore a 55 °C in presenza di sonde fredde (non radioattive) di mRNA antisenso di GATA-4, Nkx-2.5 o prodinorfina, generate come sopra descritto in assenza di ribonucleotidi radiomarcati. I campioni sono stati quindi incubati con una miscela di RNase A e T1 ed esposti a proteinasi K. I frammenti ibridi sono stati recuperati mediante estrazione fenolo/cloroformio e separati con elettroforesi su gel di poliacrilamide non denaturante. L' RNA nucleare radiomarcato è stato anche ibridizzato con mRNA antisenso della ciclofilina sintetizzato da un vettore pBS linearizzato con NcoI e contenente un frammento di 270 bp del clone pIB15 della ciclofilina di ratto. L' mRNA della ciclofilina è stato utilizzato come mRNA costante di controllo.

**Esempio 1. Induzione di trascritti cardiogenetici e cardiospecifici in cellule staminali GTR1 trattate con esteri dell'acido ialuronico.**

In questi studi furono utilizzate cellule staminali GTR1. Si tratta di una linea derivata da cellule totipotenti murine R1 (Nagy A, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:8424-8428), contenenti un gene chimerico costituito dal promotore di "alpha-myosin heavy chain" seguito da un gene in grado di indurre resistenza alla puromicina (Ventura C. et al. *J*

*Biol. Chem.* 1997;272:6685-6692). Il promotore per un gene cardiospecifico (es. "alpha-myosin heavy chain") "guida" un gene codificante per una proteina in grado di conferire resistenza cellulare ad uno specifico chemioterapico. Le cellule possono essere mantenute in uno stato indifferenziato in presenza di "Leukemia Inhibitory Factor (LIF)". La sostanza era presente ad una concentrazione finale di 1000 U/ml. Il medium di coltura era DMEM, contenente siero fetale bovino (FBS) al 15%. Per indurre il differenziamento, è necessario rimuovere il LIF. Le cellule sono state così coltivate, senza LIF, in DMEM contenente FBS al 15% su piastre Petri per coltura batterica. Dopo 2 giorni i risultanti corpi embrionali (EBs) sono stati trasferiti in piastre in grado di indurre l'adesione cellulare ("tissue culture dishes"). Dopo 3-5 giorni, alla comparsa delle prime contrazioni cellulari, segno dell' inizio dell' orientamento cardiogenetico di una parte delle cellule in coltura, viene aggiunta la puromicina alla concentrazione finale di 2 µg/ml. Le cellule orientate verso la cardiogenesi oltre al promotore nativo attiveranno anche quello del gene chimerico e, risultando resistenti al chemioterapico, potranno essere separate dalle restanti cellule "non miocardiche". In questo modo è possibile selezionare mediante un approccio innovativo di "gene trapping" le sole cellule che hanno intrapreso un processo di cardiogenesi.

Dopo la rimozione del LIF e durante la selezione con puromicina, le cellule GTR1 furono esposte ai diversi esteri retinoici dell'acido ialuronico. Gli EBs, raccolti in diverse fasi del processo cardiogenetico, ed i cardiomiociti selezionati con puromicina, sono stati processati per l'



analisi di specifici profili di espressione genica correlati all'induzione della cardiogenesi o all'avvenuta specificazione di un fenotipo miocardico. Fu infine quantificato il numero di colonie contrattili come indicatore della resa del processo di differenziamento cardiaco.

La figura 1 mostra un' analisi quantitativa condotta mediante "RNase protection" dell' espressione di alcuni geni induttori di cardiogenesi in cellule GTR1 trattate in assenza e in presenza di esteri retinoici dell'acido ialuronico dopo la rimozione del LIF. E' evidente come sia nei corpi embrioidi raccolti 5 giorni dopo la rimozione del LIF, sia nei cardiomiociti selezionati con puromicina, gli esteri retinoici dell'acido ialuronico fossero in grado di indurre un aumento rimarchevole dei livelli di mRNA di GATA-4 ed Nkx-2.5. Il primo di tali trascritti codifica per un fattore di trascrizione della famiglia delle "zinc fingers", mentre il secondo induce l' espressione di un "homeodomain". Entrambi i fattori di trascrizione svolgono un ruolo cruciale nel differenziamento cardiaco durante il periodo embrionale in diverse specie animali, uomo incluso (Lints TJ, et al. *Development*, 1993;119:419-431. Schott JJ et al. *Science*. 1998;281:108-111. Benson DW, *J Clin Invest*. 1999;104:1567-1573). Inoltre, mutazioni a livello di tali geni sono state recentemente associate alla comparsa di gravi anomalie dello sviluppo cardiaco non compatibili con la sopravvivenza nel periodo neonatale (Schott JJ, et al *Science*. 1998;281:108-111. Benson DW, et al. *J Clin Invest*. 1999;104:1567-1573). La figura 1 mostra come la sostanza in oggetto producesse anche un marcato aumento dell' espressione del gene della prodinorfina, i cui prodotti peptidici sono risultati in grado di innescare e



orchestrare la stessa espressione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 in cellule staminali (Ventura C, Maioli M. *Circ Res.* 2000;87:189-194). Simili risultati sono stati prodotti dagli altri HRE (HRE-15 ed HRE-16). Inoltre tutti gli HRE testati hanno prodotto un notevole aumento dell'espressione di trascritti cardiospecifici codificanti per "alpha-myosin heavy chain" (MHC) e per "myosin light chain-2V" (MLC) (figura 2).

Nessun cambiamento significativo dell'espressione dei geni GATA-4 ed NKx-2.5 è stato esponendo le cellule GTR1 ad acido ialuronico (0.75 mg/ml).

**Esempio 2. Misura della velocità di trascrizione dei geni cardiospecifici in cellule staminali.**

Esperimenti di "nuclear run-off" condotti su nuclei isolati da cellule trattate con esteri retinoici dell'acido ialuronico hanno dimostrato che gli effetti prodotti sull'espressione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 (figura 3) e sull'espressione del gene della prodinorfina (figura 4) erano riconducibili ad un effettivo aumento della velocità di trascrizione genica, escludendo così un mero effetto della sostanza a livello di stabilità dell'mRNA. Gli effetti prodotti dagli esteri retinoici dell'acido ialuronico sull'espressione di geni cardiogenetici e cardiospecifici sono stati antagonizzati dalla presenza nel terreno di coltura di cheleritina, specifico inibitore della protein kinasi C (PKC) (figure 2-4). Questo risultato suggerisce il coinvolgimento di una via di trasduzione del segnale PKC-dipendente nell'effetto cardiogenetico prodotto dalle sostanze oggetto di studio.

**Esempio 3. Analisi comparativa del procedimento cardiogenetico nel suo complesso.**

La figura 5 mostra un'analisi comparativa della resa del processo cardiogenetico in cellule GTR1 coltivate in assenza ed in presenza di esteri retinoici dell'acido ialuronico. Le cellule furono coltivate in assenza (cerchio vuoto) o in presenza (cerchio pieno) di esteri retinoici dell'acido ialuronico (0.75 mg/ml) per un periodo complessivo di 10 giorni. Il numero di colonie di cardiomiociti caratterizzate da attività contrattile spontanea è stato considerato come indice della specificazione di un fenotipo miocardico embrionale.

E' evidente come gli esteri retinoici dell'acido ialuronico siano in grado di produrre un marcato aumento del numero di colonie di cardiomiociti dotati di attività contrattile, indicazione fenotipica di avvenuta cardiogenesi.

**Esempio 4. Trattamento di cellule staminali totipotenti con esteri misti dell'acido retinoico.**

In una serie separata di esperimenti, le cellule GTR1 sono state esposte all' azione di esteri misti dell' acido retinoico con acido ialuronico e butirrato (0.75 mg/ml). Dopo 8 giorni fu possibile osservare un significativo aumento delle colonie contrattili in seguito a trattamento con tali sostanze non solo rispetto a quanto osservato nelle piastre di controllo non trattate ma anche rispetto alle piastre trattate con i singoli esteri retinoato-ialuronato (Figura 5). Questi effetti erano accompagnati dall' attivazione di un programma di geni cardiogenetici comprendente l' induzione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 e un aumento dell' espressione del gene della prodinorfina.

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che gli esteri retinoici



dell'acido ialuronico e gli esteri misti dell'acido retinoico con ialuronato e butirrato si comportano come potenti agenti morfogenetici in grado di indurre e orchestrare il processo della cardiogenesi in cellule embrionali staminali totipotenti.



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters.

**RIVENDICAZIONI**

1. Uso di esteri ialuronici dell'acido retinoico come agenti prodifferenzianti di cellule staminali.
2. Uso secondo la rivendicazione 1 dove tali esteri sono caratterizzati da un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.00001 e 0.5 o ancor più preferibilmente tra 0.001 e 0.1.
3. Uso secondo la rivendicazione 1 dove tali esteri sono esteri misti dell'acido ialuronico con gli acido retinoico butirrico.
4. Uso secondo la rivendicazione 3 dove tali esteri misti sono caratterizzati da un grado di sostituzione con acido butirrico compreso tra 0.05 e 1.0, un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1 ed un rapporto tra il grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico (Ds AR/Ds AcBu) di almeno 6.
5. Uso secondo la rivendicazione 1 dove tali cellule staminali sono di mammifero.
6. Uso secondo la rivendicazione 5 dove tali mammiferi sono scelti tra: H. sapiens, primati, primati superiori, roditori, suini, bovini.
7. Uso secondo le rivendicazioni 1-6 dove tali cellule staminali sono di derivazione embrionale o somatica
8. Uso di esteri polisaccaridici dell'acido retinoico per la preparazione di farmaci prodifferenzianti di cellule staminali.
9. Uso secondo la rivendicazione 8 per la preparazione di farmaci prodifferenzianti in senso cardiogenetico.
10. Uso secondo la rivendicazione 9 nella preparazione di farmaci per il



trattamento e la prevenzione di danni del miocardio e nelle cardiopatie

11. Uso secondo la rivendicazione 10 dove il danno del miocardio è infarto del miocardio.
12. Procedimento per la preparazione di cardiomiociti in vitro che comprende essenzialmente una fase di incubazione di cellule staminali con esteri retinoici dell'acido ialuronico ed opzionalmente selezione delle unità contrattili comprendenti detti cardiomiociti.
13. Procedimento secondo la rivendicazione 12 dove tali esteri retinoici sono caratterizzati da un grado di sostituzione dell'acido ialuronico con acido retinoico compreso tra 0.00001 e 0.5.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 12 dove tali esteri retinoici sono esteri misti dell'acido ialuronico con gli acido retinoico butirrico.
15. Procedimento secondo la rivendicazione 14 dove tali esteri misti sono caratterizzati da un grado di sostituzione con acido butirrico compreso tra 0.05 e 1.0, un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1 ed un rapporto tra il grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico ( $Ds\ AR/Ds\ AcBu$ ) di almeno 6.
16. Procedimento secondo la rivendicazione 12 dove le cellule staminali sono autologhe o eterologhe
17. Procedimento secondo la rivendicazione 16 dove la selezione avviene mediante "gene-trapping".
18. Procedimento secondo la rivendicazione 16 dove dette cellule staminali sono scelte tra: P19, cellule D3, cellule R1, cellule GTR1.



19. Procedimento per la selezione di nuove molecole con attività di modulazione della cardiogenesi comprendente il procedimento in accordo con le rivendicazioni 12-18 ed opzionalmente un passaggio di ottimizzazione delle molecole selezionate.
20. Procedimento per la preparazione di un modello cellulare *in vitro* per il differenziamento cardiogenetico di cellule staminali, comprendente essenzialmente una fase di incubazione di dette cellule staminali con esteri retinoici dell'acido ialuronico da soli o in combinazione con altre sostanze, in opportuno terreno di crescita.
21. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove tali esteri retinoici sono caratterizzati da un grado di sostituzione dell'acido ialuronico con acido retinoico compreso tra 0.00001 e 0.5.
22. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove tali esteri retinoici sono esteri misti dell'acido ialuronico con gli acido retinoico butirrico.
23. Procedimento secondo la rivendicazione 22 dove tali esteri misti sono caratterizzati da un grado di sostituzione con acido butirrico compreso tra 0.05 e 1.0, un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1 ed un rapporto tra il grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico ( $Ds\ AR/Ds\ AcBu$ ) di almeno 6.
24. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove dette cellule staminali sono scelte tra cellule: P19, D3, R1, GTR1, H1, H7, H9, H9.1 e H9.2
25. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove tale incubazione è seguita da un passaggio di selezione delle unità contrattili



comprendenti cellule differenziate in cardiomiociti.

(SM/pd)

Milano, lì 14 Gennaio 2003

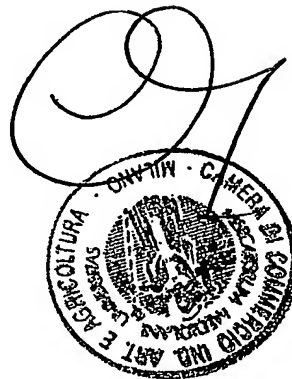
p. COIMEX s.c.r.l. UNITED COMPANIES

Il Mandatario

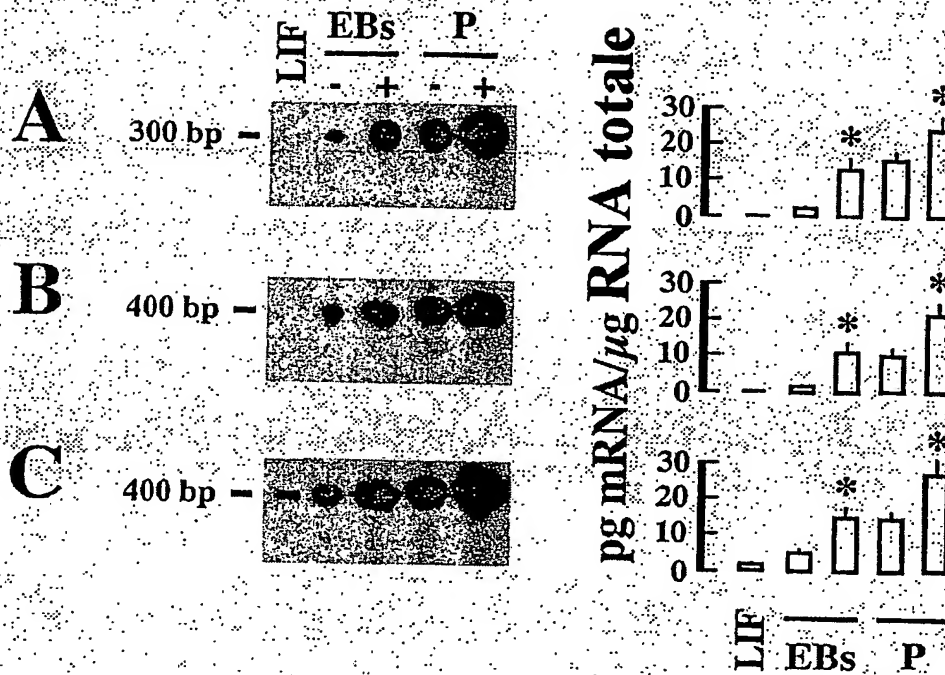
  
Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

SM

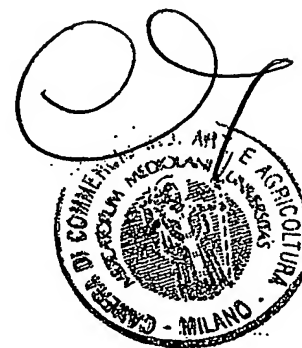


*g. Min*

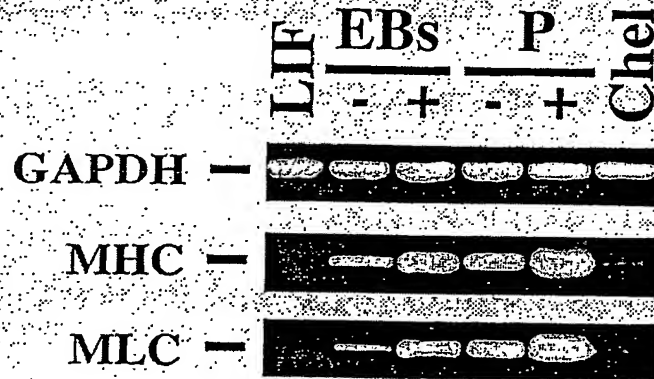


**Fig. 1**

MI 2003 A 0 0 0 0 4 3

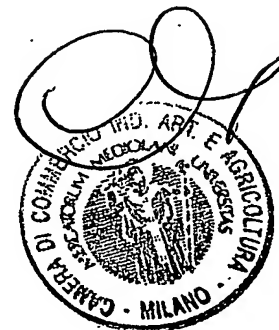




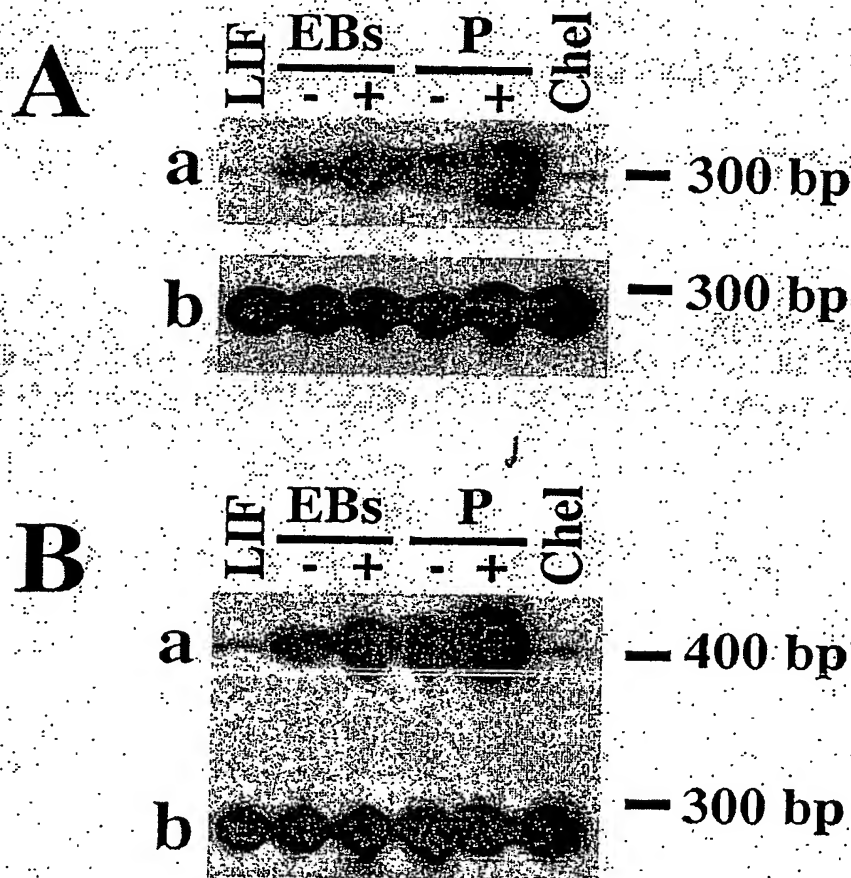


**Fig. 2**

MI 2003 A 0 0 0 0 4 3



*Fluor*

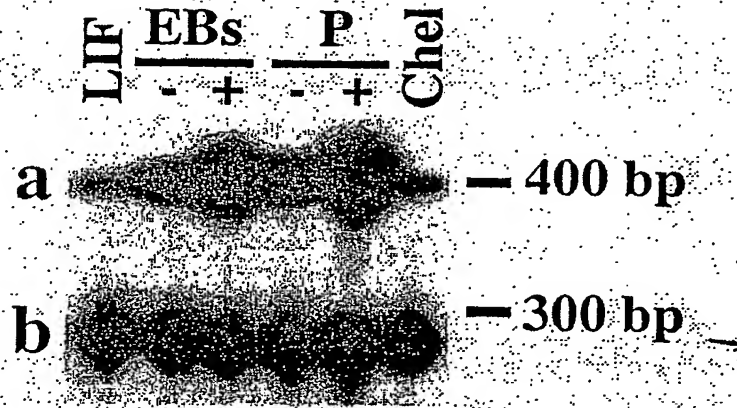


MI 2003 A 0 0 0 0 4 3

**Fig. 3**



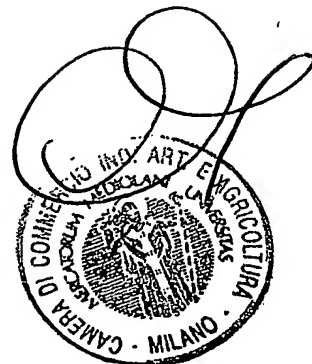
*Flaminio*



**Fig. 4**



MI 2003 A 0 0 0 0 4 3



*[Handwritten signature]*

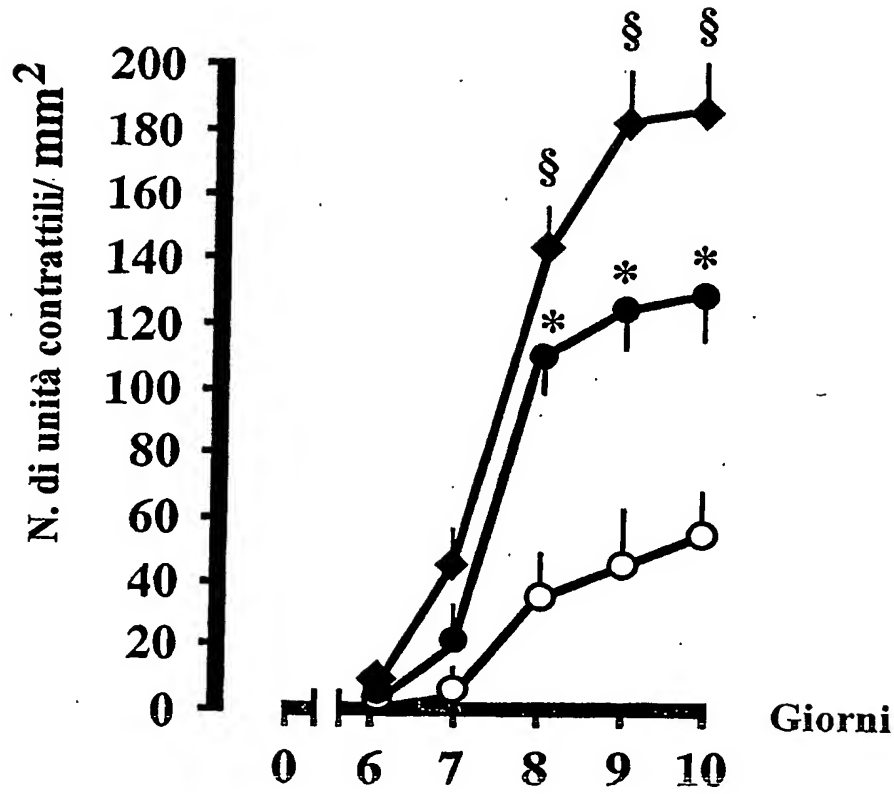


Fig. 5

MI 2003 A 0 0 0 0 4 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**